

## 結核菌の振盪培養に関する研究 (III)

## 各種サルファ剤の結核菌発育抑制作用の測定について

羽 田 忠 彦

信州大学医学部戸塚内科教室 (指導: 戸塚忠政教授)

受付 昭和 37 年 10 月 25 日

## 緒 言

当教室では Dubos 液体培地を用い、振盪しながら結核菌を培養しその Generation Time を著明に短縮し迅速培養法としてすぐれていることを明らかにし<sup>1)~4)</sup>、この振盪培養法を用いて結核菌の SM, PAS, INAH に対する耐性度の測定を行ない、基礎的ならびに臨床的に興味ある結果を得て、臨床の実際に使用しうる優れた培養法として報告<sup>5)</sup>している。

サルファ剤に抗結核菌作用のあることはすでに認められており、基礎的および臨床的に多くの報告がある。とくに INAH との併用において PAS に代りうる作用を有し、近年高く評価され臨床的にも広く用いられるようになり、さらに持続性サルファ剤の出現により副作用も少なく使用しやすくなつてきた。

サルファ剤の抗結核菌作用についての報告は種々認められているが、測定方法がまだ一定しておらず各種の方法によりその発育阻止濃度にかかなりの相違が認められている。私は数種のサルファ剤の結核菌発育抑制作用を振盪培養法を用いて 50% 発育阻止量 (ID<sub>50</sub>) によつて表現することを検討したので報告する。

## 実験材料および実験方法

使用菌株: 当教室保存の人型結核菌 H<sub>37</sub>Rv を使用した。実験にあつてこれを Dubos 液体培地に移植して、1 週間振盪培養し均等に増殖させたものを用いた。

培地: Dubos 液体培地 (栄研) を用いた。さらに荒井<sup>6)</sup>の方法に準じて培地 900 ml に Tween 80 を 5 ml 加え 120°C, 15 分間滅菌後、培地用アルブミン “栄研” を 100 ml 加えて使用した。

添加薬剤: 添加サルファ剤は Sulfisoxazole (サイアジン), Sulfadimethoxine (スルキシン), Sulfisomezole (シノミン) の 3 者を用いた。使用時にそれぞれの薬剤を 0.8% NaOH 溶液で溶解後、上記培地に加え 1 r/cc,

10 r/cc, 100 r/cc の 3 段階の濃度に希釈した (以下 1 r 培地, 10 r 培地, 100 r 培地と略す)。培地の pH はほぼ 6.8 となるようにした。対照として薬剤の含有されない培地 (以下 0 r 培地と略す) を使用した。

培養: 島津 AKA 光電比濁計の比濁セルと同質のガラスで特別に製作した L 型試験管を用い、これに各薬剤添加培地を 10 ml ずつ入れ、1 週間振盪培養した菌液を接種した。接種量は荒井<sup>7)</sup>が報告したごとく菌量が 0.1 ~ 0.2 mg/ml となるように Optical Density を 30 ~ 40 とした。以上の操作のあとに L 型試験管を孵卵器内の振盪装置に培地液面を水平にとりつけ振盪しながら 37 ± 1°C にて培養した。振盪装置の詳細は荒井<sup>7)</sup>が報告したが、当教室で考案したもので、1 分間に 30 回の振盪数で水平面に対し 13 度上下に運動する。

観察: 菌の発育は日を追つて、島津 AKA 光電比濁計により標準管 No. 5 の Optical Density を 100 とし Filter なしてその Optical Density を測定し計算した。

## 実験成績

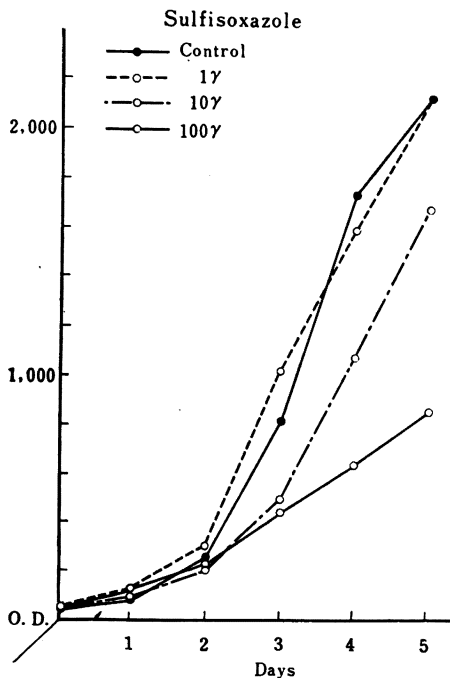
Sulfisoxazole 加培地における人型結核菌 H<sub>37</sub>Rv の発育は表 1 および図 1 に示すごとくである。0 r 培地お

Table 1. Growth of *M. tuberculosis* in the Sulfisoxazole Medium (Optical density)

Days Concn. r/cc	Onset	1	2	3	4	5
	0	29	94	228	820	1,730
1	45.2	114	300	1,020	1,590	2,120
10	33.0	89	202	494	1,065	1,670
100	46.8	114	233	440	633	885

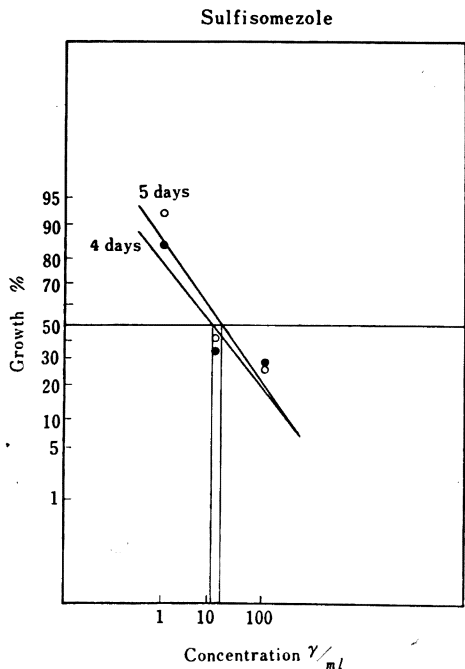
び各濃度における菌の発育の差は培養開始 3 日目までは明瞭でないが 4 日目、5 日目となるに従いかなりの差が認められ、6 日目には 0 r 培地の発育は光電比濁計にて測定不能となつた。1 r 培地では 0 r 培地とほぼ同様の

Fig 1. Growth of *M. tuberculosis* in Sulfisoxazole Medium (Optical Density)



発育を示すが、10γ培地、100γ培地と薬剤濃度が高くなるに従って発育抑制の増強が認められ、おのおのの Generation Time も表5に示すごとく高濃度になるに従って延長が認められる。しかし100γ培地においても

Fig 2. Estimation of ID<sub>50</sub> of Sulfisoxazole



完全に発育を抑えることはなく、培養日数の増加とともに次第に濁度も増加し、荒井<sup>5)</sup>が報告した PAS, SM, INAH における迅速耐性測定法をそのまま準用してその完全発育阻止濃度を図1より読みとることは困難である。

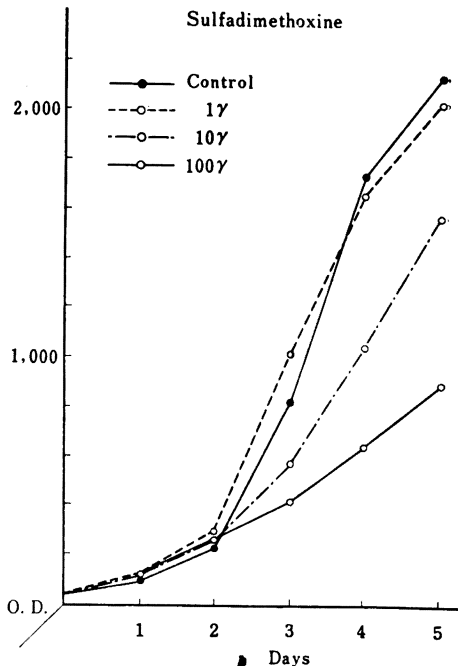
そこで Sulfisoxazole について Treffers<sup>6)</sup>の用いた50%発育抑制価 (ID<sub>50</sub>) を応用すると図2のごとなる。すなわち確率紙の横軸に薬剤濃度を取り、縦軸に0γ培地における発育に対する各濃度での発育の程度を%で表わした価 Growth % をとる。各濃度における Growth % を plot し、これらの点を結ぶ直線が50%の線と交叉する点よりその ID<sub>50</sub> を算出した。培養開始後4日目および5日目についてそれぞれ ID<sub>50</sub> を算出した結果は表4のごとくで、4日目では35.5γ/cc 5日目では63.0γ/cc であつた。

以下同様に Sulfadimethoxine および Sulfisomezole 加培地における人型結核菌 H<sub>37</sub>R<sub>v</sub> の発育は表2、表3。

Table 2. Growth of *M. tuberculosis* in the Sulfadimethoxine Medium (Optical density)

Days Concn. γ/cc	Onset	1	2	3	4	5
0	29	94	228	820	1,730	2,120
1	43.6	108	300	1,020	1,605	2,020
10	43.6	105	247	580	1,045	1,570
100	43.6	104	233	420	647	887

Fig 3. Growth of *M. tuberculosis* in Sulfadimethoxine Medium (Optical Density)



および図3, 図5に示すごとくであり, 高濃度になるに従つて発育抑制の増強が認められ Generation Time も表5のごとく延長を示したが Sulfisoxazole と同様にその完全発育阻止濃度の決定は困難であつた。その ID<sub>50</sub> は図4, 図6および表4のごとく Sulfadimethoxine で

Fig 4. Estimation of ID<sub>50</sub> of Sulfadimethoxine

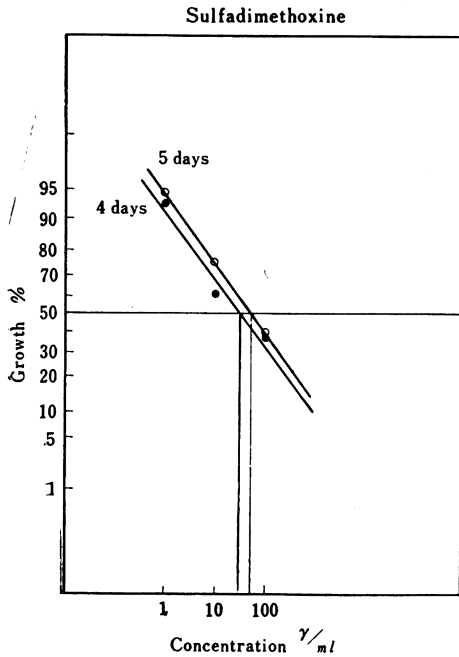


Fig 5. Growth of *M. tuberculosis* in Sulfisomezole Medium (Optical density)

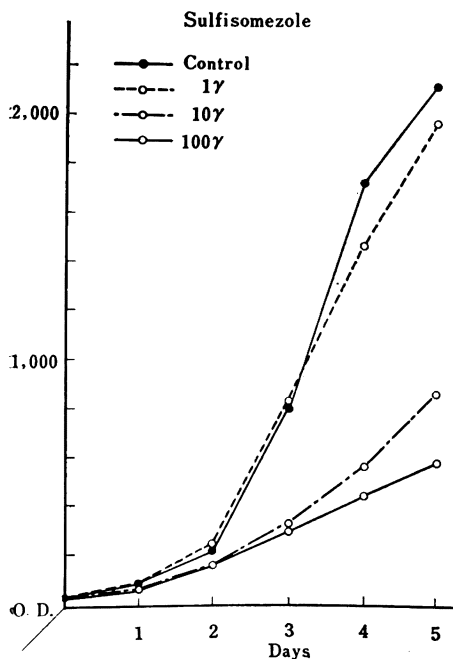


Table 3. Growth of *M. tuberculosis* in the Sulfisomezole Medium (Optical density)

Days Concn. γ/cc	Onset	1	2	3	4	5
0	29	94	228	820	1,730	2,120
1	37.1	96	260	835	1,475	1,965
10	29.0	76.5	167	334	567	880
100	37.1	93	167	314	454	593

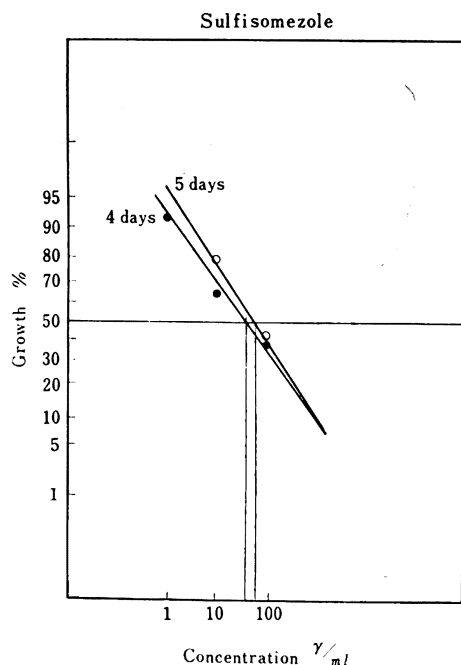
Table 4. ID<sub>50</sub> of Sulfonamides to the *M. Tuberculosis*, H<sub>37</sub>Rv

Drug	Days	4	5
Sulfisoxazole		35.5 γ/cc	63.0 γ/cc
Sulfadimethoxine		35.5 γ/cc	41.7 γ/cc
Sulfisomezole		11.2 γ/cc	14.1 γ/cc

Table 5. Generation Time of *M. Tuberculosis*, H<sub>37</sub>Rv in the Dubos Medium with Shaking Culture

Concentration of sulfonamides	Days	Generation time (hours)
Sulfisoxazole	1	19.9
	10	20.0
	100	33.4
Sulfadimethoxine	1	19.9
	10	23.0
	100	31.3
Sulfisomezole	1	16.9
	10	27.3
	100	33.4

Fig 6. Estimation of ID<sub>50</sub> of Sulfisomezole



は培養開始後4日目で35.5  $r/cc$ 、5日目で41.7  $r/cc$  となり、Sulfisomezole ではそれぞれ11.2  $r/cc$ 、14.1  $r/cc$  となる。

Sulfisoxazole, Sulfadimethoxine および Sulfisomezole の人型結核菌 H<sub>37</sub>Rv に対する発育抑制作用を比較してみると、Generation Time あるいは発育曲線のみでは単純に比較できないが、ID<sub>50</sub> では表4のごとくであり、3剤のうちでは Sulfisomezole が H<sub>37</sub>Rv に対しても最も強い発育抑制作用を示し、Sulfadimethoxine と Sulfisomezole はほぼ同様の発育抑制を示した。

### 考 案

著者は振盪培養法を用いて Sulfisoxazole および持続性サルファ剤の Sulfadimethoxine, Sulfisomezole の人型結核菌 H<sub>37</sub>Rv に対する発育抑制作用を測定することを試みた。培養開始後4日目より、添加薬剤の濃度が高くなるに従い Generation Time の延長が認められ発育抑制力の増強することは明らかであるが、実験濃度でその完全発育阻止濃度を知ることは困難であった。そこで Treffers ら<sup>9)</sup>の報告した50%発育抑制 (ID<sub>50</sub>) を求める方法を応用したところ、4日ないし5日で測定可能であり、サルファ剤のごとく抗菌力の差の少ない薬剤のおのおのを比較するのに好適であった。

各サルファ剤の抗菌力の差についての報告も多く試みられているが、3剤または2剤について試み差を認めるものと差を認めない報告<sup>7)~15)</sup>とがある。著者の実験では ID<sub>50</sub> により比較すると表4のごとくであり Sulfisomezole がやや優れた抗菌力を示し、Sulfisoxazole と Sulfadimethoxine はほぼ同様の阻止力を示し、数量的に客観的に薬剤間の差を比較することが可能であった。

このような報告者および薬剤による相違はサルファ剤が単に静菌的に作用することのみでなく、使用菌株、培地の種類および pH、接種菌量、菌の培養日数、さらに判定基準などの因子に左右されることが考えられる。使用菌株は若い菌株ほど薬剤に作用されやすく、抗菌力測定には若い菌を用うべきことを森下<sup>16)</sup>が報告しており、この意味では振盪培養により得た菌を用いたことは有意であると考えられる。

培地の種類としては一般に固型培地によるほうが液体培地によるものに比べ阻止濃度が低い値を示している報告が多い。貝用<sup>18)</sup>によると Sulfisoxazole については小川培地では20  $r/cc$ 、キルヒナー培地では50  $r/cc$ 、Dubos 培地では200  $r/cc$  の阻止濃度を得ており、著者が比較的高い ID<sub>50</sub> を得たことは Dubos 培地を用いたためと考えられる。培地の pH の阻止濃度に与える影響について、内藤<sup>17)</sup>は pH 5.5 では 62.5  $r/cc$ 、pH 7 以上では 1,000  $r/cc$  と酸性になるに従い阻止力の増強することを述べている。接種量による阻止濃度の影響は一般に菌量に反

比例するという報告<sup>18)~20)</sup>が多い。培養日数は長期にわたると薬剤の力価が減少し阻止濃度の上昇を思わせることがあるから判定はできるかぎり短期日に行なうのがよく、著者の方法では4日ないし5日で判定しており、この点有利である。判定基準としては一般に固型培地ではコロニーの数により判定し、液体培地では対照と比較し肉眼的に発育の有無を決定しており、阻止濃度の決定上に無理があり、差の生ずる一因と考えられる。この点 Optical Density による測定は客観的に数量的に表現可能である。

結核菌に対する薬剤の抗菌力測定の方法には種々のものがあり、測定方法により抗菌力に若干の差が認められることがあるが、サルファ剤の場合とくに報告者による差が著明であり Sulfisoxazole, Sulfadimethoxine および Sulfisomezole の3剤についても最低5  $r/cc$  より最高1,000  $r/cc$  と阻止濃度にかんがりの差が認められる<sup>7)~15), 17), 21)~27)</sup>。

抗菌力測定にさいして理想的な条件としては、薬剤が培地内で均等に混和し、菌に対し均一に作用する必要があり、菌の発育が迅速で雑菌の生えにくいことと、薬剤添加後に加熱等の処置を要せず、客観的に明確に判定でき、判定までの時間が短く、かつ手技の簡単であることが必要である。

現在もつとも一般的な方法として使用されている固型培地による場合は培地の保存が可能であり手技も簡単で使用しやすいが、培地保存による薬剤力価の低下を考慮しなければならず<sup>28) 29)</sup>、また薬剤添加後の滅菌による力価の減少と卵白の吸着による有効薬剤濃度の減少を考慮すべきであり<sup>30)</sup>、判定までの培養期間が長い場合薬剤力価の減少により抗菌力が低く判定されるおそれがある。その他の抗菌力測定法としては直立拡散法<sup>31)</sup>、Slide Culture を用いる方法<sup>32)</sup>等種々<sup>33) 34)</sup>あるが、それぞれ長所、短所を有する方法である。一方、液体培地を用い希釈法による抗菌力の測定についても多くの報告があり、サルファ剤についても種々の報告が認められている。液体培地は添加薬剤が均等に混和し菌に均一に作用し、薬剤添加後に加熱することなく熱に弱い薬剤の抗菌力測定が可能であり、抗菌力測定には理想的と考えられるが固型培地に比べ手技がやや繁雑であり、また雑菌の混入しやすいおそれがある。また判定にさいしても固型培地による場合より問題が多い。

液体培地の振盪培養により抗酸菌の発育を促進させることは多くの学者<sup>35)~42)</sup>により報告されており、当教室でもすでに良好な結果を得て報告<sup>1)~4)</sup>した。この振盪培養法を用いて薬剤の抗菌力測定に良好な結果を得たことを教室の荒井<sup>5)</sup>がすでに報告しており、荒井は SM, PAS, INAH について行ない4日目に判定可能であることを述べている。青柳<sup>40)</sup>も同様に良好な結果を得てお

り、振盪培養法が抗菌力測定に優れた方法であることを報告している。

サルファ剤の抗菌力測定に著者のごとく振盪培養法を用いた報告はみられない。しかしながらサルファ剤の抗菌力が比較的弱いため、荒井の行なつた方法をもつてしては完全発育阻止濃度を知ることは困難であつた。

ID<sub>50</sub>を用い結核菌に対する抗菌力の測定を行なつたのは本邦では青柳<sup>40)</sup>、矢込<sup>43)</sup>の報告がある。青柳は Tween 80 加 Sauton 培地を用い、振盪培養法により SM, PAS, INAH 等の抗菌力の測定を行ない、人型結核菌では 48 時間以内に再現性ある ID<sub>50</sub> を得ることができたことを報告している。矢込は Dubos 培地を用い静置培養により INAH の抗菌力を測定し、短期間で高い精度の結果を得、しかも日常検査法として特別の装置の必要なく行なえることを述べている。この ID<sub>50</sub> の概念によりサルファ剤の抗結核菌作用の測定を行なつた報告は認められていないが、サルファ剤では完全発育阻止濃度を決定する方法より ID<sub>50</sub> による抗菌力の表示のほうが適しており、かつ薬剤間の抗菌力の差を数量的に知りうる点がとくに優れているものと考えられる。著者はかかる考えのもとに各種サルファ剤の抗結核菌力の測定を行ない 4 日目ないし 5 日目に判定可能であり良好な結果を得た。

### 結 語

人型結核菌 H<sub>37</sub>Rv を用い Sulfisoxazole, Sulfadimethoxine および Sulfisomezole を Dubos 培地に添加し、振盪培養法により迅速にこれら薬剤の抗菌力を測定することを検討し、次の結果を得た。

1) 50%発育抑制値 (ID<sub>50</sub>) を表より読みとることにより各薬剤の抗菌力を客観的に数量的に判定することが可能であつた。

2) 振盪培養法により培養開始後 4 日目ないし 5 日目に判定可能であつた。

3) サルファ剤の種類により抗菌力に若干の差が認められ、Sulfisomezole がやや強い抗菌力を示し Sulfisoxazole と Sulfadimethoxine はほぼ同様の抗菌力を示した。

本論文の要旨は第 28 回日本内科学会信越地方会において報告した。

稿を終るに臨み種々懇篤なご指導ご校閲を賜つた恩師戸塚忠政教授ならびに種々御助力いただいた勝又昭司博士に深謝致します。

### 参 考 文 献

- 1) 戸塚忠政 他：日本内科学会雑誌，47：433，昭 33.
- 2) 戸塚忠政 他：日本医事新報，—1740：42，昭 32.
- 3) 呉真一・勝又昭司：日本内科学会雑誌，46：771，昭 32.
- 4) 荒井聖二：信州医学雑誌，8：1212，昭 34.
- 5) 荒井聖二：信州医学雑誌，8：1701，昭 34.
- 6) Treffers, H. P.: J. Bact., 72: 108, 1956.
- 7) 塩田憲三：結核，36：106，昭 36.
- 8) 岡武雄：内科の領域，9：26，昭 36.
- 9) 杉浦宏政：結核，35：688，昭 35.
- 10) 東村道雄：Chemotherapy, 8: 268, 1960.
- 11) 桜井宏 他：日本胸部臨床，19：336，昭 35.
- 12) 中村彰：日赤医学，13：245，昭 35.
- 13) 影浦正輝：大阪大学医学雑誌，11：395，昭 34.
- 14) 熊谷岱蔵 他：日本医事新報，1945：3，昭 36.
- 15) 貝田勝美 他：最新医学，15：1338，昭 35.
- 16) 森下昭三：胸部疾患，4：585，昭 35.
- 17) 内藤益一：日本臨床結核，15：674，昭 31.
- 18) Michael, K. et al.: Am. Rev. Tuberc., 72: 390, 1955.
- 19) Youmans, G. P. et al.: J. Bact., 54: 409, 1947.
- 20) 河田利延：京都大学結核研究所紀要，7：12，昭 34.
- 21) 小川政敏：日本臨床結核，15：778，昭 31.
- 22) 牛場大蔵：日本臨床結核，15：665，昭 31.
- 23) 中川保男：新薬と臨床，6：7，昭 32.
- 24) 斉藤紀仁：日本臨床結核，15：694，昭 31.
- 25) 伊藤善朗：日本臨床結核，15：675，昭 31.
- 26) 谷脇舜：結核の研究，11：15，昭 36.
- 27) 松下文一：内科の領域，8：774，昭 35.
- 28) 工藤祐是：結核，36：480，昭 36.
- 29) 小川政敏 他：最新医学，9：148，昭 29.
- 30) 小川辰次：結核菌検索の基礎と応用，240，昭 26.
- 31) 小川政敏：結核，36：475，昭 36.
- 32) Pierce, C.H.: Am. Rev. Tuberc., 75: 331, 1957.
- 33) Mac Vandiviere, H.: Am. Rev. Resp., 84: 399, 1961.
- 34) Kubica, G. P.: Am. Rev. Resp., 83: 4, 1961.
- 35) Dubos, R. J.: J. Exp. Med., 97: 377, 1953.
- 36) Cohn, M. L.: Am. Rev. Tuberc. 49: 463, 1944.
- 37) Kempner, W.: Am. Rev. Tuberc., 40: 157, 1939.
- 38) Weiss, D.W.: Am. Rev. Tuberc., 79: 812, 1959.
- 39) Miller, I.L.: Am. Rev. Tuberc., 73: 716, 1956.
- 40) 青柳高明 他：日本細菌学雑誌，12：819，昭 32.
- 41) 川村達：日本細菌学雑誌，12：561，昭 32.
- 42) 土屋皖司：日本細菌学雑誌，14：24，昭 34.
- 43) 矢込堅太郎：結核，33：760，昭 33.

**Studies on Growth of Mycobacterium Tuberculosis with Shaking Culture Method. (III) Estimation of the Antituberculous Action of Sulfonamides.**

Many authors has reported that the mechanism of the action of sulfonamides on *M. tuberculosis* is bacteriostatic, and it is difficult to determine the complete inhibition dosis.

By shaking culture method, in this study, the author estimated the antituberculous action of sulfonamides and calculated the 50% inhibition dosis ( $ID_{50}$ ).

The test strain was *M. tuberculosis* var. *hominis*, strain H<sub>37</sub>Rv and sulfoxazole, sulfadimethoxine and sulfisomezole were tested, of which the last two were the long-acting sulfonamides.

On the 4th day or the 5th day after the start of

the culture, growth of *M. tuberculosis* was estimated with optical density and the  $ID_{50}$  was calculated from it.

$ID_{50}$  of sulfoxazole was 35.5  $\gamma$ /cc after 4 days and 63.0  $\gamma$ /cc after 5 days,  $ID_{50}$  of sulfadimethoxine was 35.5  $\gamma$ /cc after 4 days and 41.7  $\gamma$ /cc after 5 days,  $ID_{50}$  of sulfisomezole was 11.2  $\gamma$ /cc after 4 days and 14.1  $\gamma$ /cc after 5 days, respectively.

Sulfisomezole had the most active antituberculous action in vitro to the test strain of *M. tuberculosis*. Sulfadimethoxine and sulfisomezole almost showed the same antituberculous action.

The estimation of the  $ID_{50}$  with the shaking culture method makes it possible to determine the antituberculous action of sulfonamides objectively and quantitatively.